DNA すいすい

-VS

DS-0004

～DNA 簡易抽出バッファー～

粘性物質の多い農産物向け

取扱説明書

Ver. 1.0

RIZO Inc.

目次

本製品の特長

本製品は、粘性物質が多く含まれる農産物*からの DNA 簡易抽出に最適な抽出バッファーです。ホモジナイズした溶液が高い粘性を示すようなネギ、メカブ、ナメコなどに最適です。抽出した DNA はそのまま PCR 反応に使用できます。

*サンプルの状態によっては DNA 自体が分解され、抽出できない場合がございます。

内容物

抽出バッファー　85 mL（約 110 回分）
添加剤　（粉末）　2 本
添加剤溶解液　10 mL×1 本
DNA 沈殿補助溶液*

＊ご使用前に 60 ml のイソプロパノールを添加して下さい

保存条件と使用期限

保存条件　冷蔵保存（4℃）して下さい。
使用期限　添加剤（添加剤溶解液を混合後）；1 カ月*
　抽出バッファー；開封後 6 カ月
　DNA 沈殿補助溶液；調製後 6 カ月
（*溶解後の添加剤は、小分けして冷凍することで長期保存可能です）

使用上の注意

本試薬は研究目的以外にご使用にならないでください。また、分子生物学に関する基本的知識のある方以外は取り扱わないでください

*記載内容や製品仕様、および価格に関しては予告なしに変更する場合がございます。

その他必要な試薬・機器

試薬

イソプロパノール（特級）

エタノール（特級）

フェノール：クロロホルム（1：1、v/v）*

70% エタノール**

TE （10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）もしくは

蒸留滅菌水

*結晶フェノールをトリスバッファー（pH 8.0）で飽和させたトリス飽和フェノールに対しクロロホルムを１：１の容積比で混合したものをご利用ください。又は、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール（25:24:1、SIGMA 社製 Cat. No. P2069 など）でも代用可能です。

**エタノール（分子生物学用）：蒸留滅菌水を７：３の容積比で混合したものをご利用ください。

機器

冷却微量高速遠心機

その他

1.5 ml チューブ

マイクロピペット（1,000 μl用、200 μl用）

ピペットチップ

実験を開始する前の準備

①添加剤の準備

本製品に添付の添加剤溶解液（青ラベル）5 ml を添加剤（赤ラベル）に入れ、よく混合します*。この調製済み添加剤は DNA 抽出の直前に *DNA すいすい-VS* に添加して使用します。

*調製後の添加剤は、使用期限が１カ月ですのでご注意ください。実験に使用するまで暗所で冷蔵保存（4℃）もしくは小分けして冷凍保存してください。

②DNA 沈殿補助溶液の準備

DNA 沈殿補助溶液のボトルに 60 ml のイソプロパノールを添加し、よく混合します。調製後は冷蔵（4℃）して下さい。

分析試料からの DNA 抽出プロトコール

分析試料 1 検体あたり、720 μlの *DNA すいすい-VS* と
80μlの調製済添加剤を混合し注①、これを分析試料数分ご用意下さい。

1. 新しい 1.5 ml チューブに、400 μlの添加剤入り *DNA すいすい-VS* を入れた後②、30-50 mg の分析試料を加えます注③。

2. マイクロチューブ用ペッスルなど注④で分析試料をホモジナイズします。

3. 400 μlの添加剤入り *DNA すいすい-VS* をさらに加え、転倒混和します。

4. フェノール：クロロホルム（1：1、v/v）を 500 μl加え、転倒混和します。

5. 15,000 rpm、室温（20～25℃）で 10 分間遠心分離を行います。

6. 上清 600 μlを新しい 1.5 ml チューブにとり、99.5% エタノールを 480 μl（上清の 0.8 倍量）添加し、よく混和します注⑤。

7. 3,000 rpm、室温で 1 分間遠心分離を行います。

8. 沈殿を吸い上げないように注意しながら、上清 700 μlを新しい 1.5 ml チューブにとり、調製済みの DNA 沈殿補助溶液を 700 μl（上清と等量）添加し、よく混和します。

9. 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行います。

10. 上清を捨て注⑥、70% エタノールを 1,000 μl入れ、よく転倒混和し、沈澱の洗浄を行います。

11. 15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離を行います。

12. 上清を捨て、沈澱を乾燥（風乾）注⑦します。

13. 50～100 μlの TE もしくは滅菌水に溶解し注⑧、PCR 反応用試料とします。

***注①～⑧については次ページの「注解」をご参照ください。**

注解

注①調製した添加剤は使用直前に *DNA すいすい-VS* に加え、試料数分ご準備下さい。*DNA すいすい-VS* に添加剤を加えた後、1 日以上経過したものはご使用にならないで下さい。

注②冷凍保存した組織の場合は、解凍しないうちに抽出バッファーへ浸漬して下さい。

注③分析試料を多く入れ過ぎますとDNA の収量の低下や多量の夾雑物持ち込みの原因となり、PCR 反応に影響を及ぼす可能性が考えられますので、ご注意ください。

注④1,000μl 用ピペットチップの先を、アルコールランプやライター等で炙り、先端の穴が閉じたものなどを使用しても十分なホモジナイズが可能です。

注⑤試料によっては、「6.」の操作の後に氷上で 5 分間インキュベートし、続いて「7.」の操作を行うと、粘性物質の除去がより効果的になる場合があります。粘性物がほとんど含まれない試料で本操作を行うと DNA 収量低下の原因となりますのでご注意ください。

注⑥沈澱が流出しないようご注意ください。

注⑦乾燥させすぎるとTE もしくは滅菌水への溶解が困難になります。

注⑧分析試料の生物種や状態、PCR 反応系の違いにより最適量が異なりますので、それぞれの分析試料に合わせて適宜、調製して下さい。

本プロトコールは、微量サンプルからの DNA 簡易抽出用に考案されています。

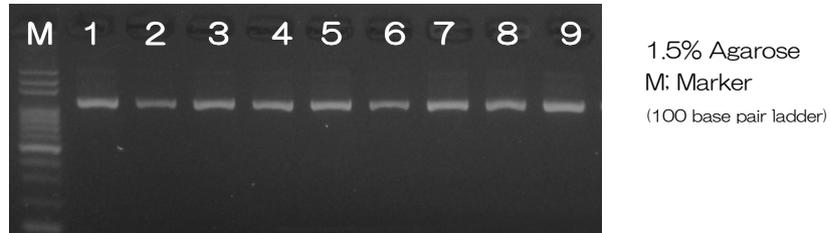
トラブルシューティング

問題	考えられる原因	対策
DNAの収量が低い。	試料のホモジナイズが不十分である可能性が考えられます。	試料をできるだけ丁寧にホモジナイズして下さい。
	試料から本製品（抽出バッファー）へのDNA抽出が不十分である可能性が考えられます。	本製品と共に試料をホモジナイズした後、よく転倒混和を行ってから次の操作に移ってください。
DNA沈殿補助溶液添加後に多量の白色沈澱が生じ、70%エタノールによる洗浄後も残存している。	分析試料に多量のタンパク質や脂質が含まれている可能性が考えられます。	DNA抽出プロトコールの「4」および「5」の操作をさらに繰り返し、タンパク質や脂質の除去を行ってください。

実験例

粘性物質が多く含まれる農産物を用いた実験

本製品を使用して DNA 簡易抽出を行い、18S rRNA 遺伝子検出用プライマー対（1,146 bp が増幅）を使用して PCR を行いました。

1.5% Agarose
M: Marker
(100 base pair ladder)

1	ネギ	6	キク（花びら）
2	サトイモ	7	リンゴ（果実）
3	ナメコ	8	アロエ
4	メカブ	9	納豆
5	バラ（花びら）		

（約 50 mg の組織から DNA 抽出を行いました。）

（PCR 反応系）

	(μl)
Template DNA*	1～3
10×Buffer	2
dNTP mixture (2.0mM each)	2
primer (4 pmol each/μl)	2
Taq** (5units/μl)	0.17
H_2O	
Total	20 μl

*DNA 抽出液を 2～100 倍に希釈したものを使用。試料や生物種により最適な DNA 濃度が異なりますのでご注意ください。
**Stratagene　Paq5000 を使用

（PCR 条件）

95℃ 2 min.
94℃ 30 sec.
55℃ 30 sec.　35 cycles
72℃ 60 sec.
72℃ 7 min.

DNAすいすいー VS

お問い合わせ先

株式会社リーゾ
研究部
茨城県つくば市天久保 2-9-2-B201
電話；029-852-9351　FAX；020-4623-5611
E-mail；info@rizo.co.jp
ホームページ；http://www.rizo.co.jp/
担当；宮川